

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-46870

(43)公開日 平成6年(1994)2月22日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 P 7/58

9282-4B

C 12 N 1/12

C 7236-4B

// (C 12 P 7/58

C 12 R 1:89)

(C 12 N 1/12

審査請求 未請求 請求項の数5(全12頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-58696

(22)出願日 平成5年(1993)3月18日

(31)優先権主張番号 853379

(32)優先日 1992年3月18日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 593053346

バイオ-テクニカル・リソーシズ・リミテッド・パートナーシップ

BIO-TECHNICAL RESOURCES L.P.

アメリカ合衆国ウイスコンシン州54220.

マニトウォツク、サウスセブンストリート1035

(72)発明者 ロナルド・ジョン・ハス

アメリカ合衆国ウイスコンシン州54220.

マニトウォツク、ミシガンアベニュー1415

(74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物におけるL-アスコルビン酸生産

(57)【要約】

【目的】 L-アスコルビン酸の改良生産方法。

【構成】 アスコルビン酸生産性微生物類特にクロレラ属を微生物源として使用し、調整型の炭素源供給の下で細胞を増殖させることによって従属栄養的生合成によるアスコルビン酸生産の改善がなされる。

【効果】 発酵槽中においてアスコルビン酸対供給される全炭素源の割合が非常に改善されると同時に該発酵槽中のアスコルビン酸の濃度が高められる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 下記工程：

(a) 細胞増殖およびL-アスコルビン酸生産に十分なそれぞれの量で適当な炭素源および溶存酸素を含有する増殖促進栄養培地中において、L-アスコルビン酸を從属栄養的に生産させうる微生物の細胞を從属栄養的に増殖し、

(b) 生物を初期段階で高細胞密度にまで増殖させ、それに付随して第1のアスコルビン酸量を生成し次いで炭素源を実質的に完全に消耗させ、

(c) (i) 細胞増殖が実質的に停止しそして (ii) それに続く調整された量の炭素源の添加が、実質的に細胞密度を全く増加させずに追加量のL-アスコルビン酸の生成をもたらすまで、細胞を溶存酸素の存在下でかつ炭素源の実質的に完全な不在下において維持し、

(d) L-アスコルビン酸生産の望ましい増加が、実質的に細胞密度の増加を伴わずに達成されるまで調整された炭素源添加を継続するからなるL-アスコルビン酸の生産方法。

【請求項2】 工程(d)における、生産されたL-アスコルビン酸の全量対全細胞密度の割合が、細胞増殖が実質的に停止しそして細胞密度の増加が止まった時の工程(c)でのかかる割合よりも大きい請求項1記載の方法。

【請求項3】 微生物が緑色の微小藻類である請求項1記載の方法。

【請求項4】 A.T.C.C. 受託No. 53170を有するChlorella pyrenoidosa菌株。

【請求項5】 UV照射によるChlorella pyrenoidosa出来のC. pyrenoidosa UV 232-1菌株。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の背景】

1. 発明の分野：本発明は、適当な炭素源を含有する栄養培地中の微生物特に微小藻類によるL-アスコルビン酸の改良生産のための從属栄養的方法に関する。特に、本発明は高濃度好ましくは細胞量単位重量当たりの高濃度のL-アスコルビン酸を生産する方法に関する。本発明はまた本発明のL-アスコルビン酸生産に使用するのに適当な新規な突然変異された微小藻類の種も提供する。

【0002】 2. 関連技術の記載：L-アスコルビン酸は重要な栄養補足物であって、ヒトおよびその他のビタミンC要求動物の両者における食物中の栄養補足物としておよびビタミンカプセルで広く使用されている。L-アスコルビン酸は極めて価格が不安定であって、市場性の高い経済的かつ効率的な生産を必要とする大量生産される化学製品である。従って、L-アスコルビン酸を効率的に生産させる栄養素の効率的変換をもたらす微生物を用いての方法を開発することが可能である点において

実質的な重要性が存在する。

【0003】 Loewus, F.A., in L-Ascorbic Acid: Metabolism, Biosynthesis, Function, The Biochemistry of Plants, Vol. 3, Academic Press, Inc., pp. 77~99, 1980にはL-アスコルビン酸の供給源および生合成についての論文が記載されている。藻類におけるアスコルビン酸生産の記述はVaidya et al., Science and Culture (1971) 37: 383~384; Subbulakshmi et al., Nutrition Reports International (1976) 14: 581~591; Aaronson et al., Arch. Microbiol. (1977) 112: 57~59; Shigeoka et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol. (1979) 29: 29~307; Shigeoka et al., Agric. Biol. Chem. (1979) 43: 2053~2058; Bayanova and Trubachev, Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya (1981) 17: 400~407(UDC 582.26:577.16); and Ciferri, Microbiological Reviews (1983) 47: 551~578に見出すことができる。

【0004】 従来技術による從属栄養の方法は商業用としては完全に満足できるものではない。アスコルビン酸生産用の炭素源の利用は一般に不十分であり、そのビタミンは望ましくない程に低い濃度で生産される。

## 【0005】

【発明の要旨】 本発明の目的は、炭素源の利用を高める炭素源からのL-アスコルビン酸の從属栄養の生合成に関する方法を提供することにある。別の目的はそのビタミンを高収量で取得する方法を提供することにある。さらに別の目的は新規組成物として新規な高L-アスコルビン酸生産性微生物を提供することにある。

【0006】 従って、本発明はL-アスコルビン酸の改良生産方法を提供することである。その方法は細胞増殖およびL-アスコルビン酸生産に適した量で炭素源および溶存酸素(O<sub>2</sub>)を含有する栄養培地中においてL-アスコルビン酸生産性微生物の細胞を從属栄養的に増殖し、該生物をそのまで初期段階において高細胞密度にまで増殖させ、それに付随して細胞内L-アスコルビン酸生産および炭素源の実質的に完全な消耗を成就し、細胞増殖が実質的に停止しそしてそれに続く調整された量の炭素源の添加が、実質的にほとんどまたは全く細胞密度を増加させずに追加量のL-アスコルビン酸の生成をもたらすまで細胞をその実質的に消耗された炭素源中に維持し、次いで実質的にほとんどまたは全く細胞密度の増加を伴わずにL-アスコルビン酸生産の望ましい増加が達成されるまで調整された炭素源添加を継続することからなる。

【0007】 すなわち、炭素源の改善された利用がL-アスコルビン酸(L-AA)生産に関して観察される。溶液1リットル当たりのL-AAのmgとして表される全L-AAの増加、好ましくはまた細胞の乾燥重量1g当たりのL-AAのmgとして表されるL-AAの比生成の増加によって証明されるように、高められた収量が得られ

る。

【0008】本発明はさらに新規な高L-AA生産性の突然変異された微小藻類、より具体的には*C. pyrenoidosa* (クロレラビレノイドサ) 単離物UTEX 1663から誘導され、1985年6月27日付で米国型培養コレクション(ATCC)に受託No. 53170で寄託された*Chlorella pyrenoidosa* UV 101-158; *C. regularis* (クロレラレグラリス) UTEX 1808から誘導された*Chlorella regularis* UV 5-280; *P. zopfii* (プロトテカゾブフィ) UTEX 1438から誘導された*Prototricha zopfii* UV 3-132; *Ankistrodesmus braunii* (アンキストロデスマスブラウニイ) ATCC 12744から誘導された*Ankistrodesmus braunii* UV 2-370を提供する。UTEXはオースチンにあるテキサス大学における藻類の培養コレクションである。

【0009】これらの新規な微小藻類組成物の生産および本発明方法におけるL-AA生産のためのそれらの有効性を以下に詳記する。

#### 好ましい実施態様の記載

一般に、本発明方法は3つの主要段階：(1) L-AAを従属栄養的に生産することが可能な微生物好ましくは微小藻類が、それぞれ該藻類が高細胞密度に増殖するのに十分な量における第1濃度での有効炭素源および溶存O<sub>2</sub>を含有する発酵槽中で従属栄養的に増殖し、それと同時に細胞内L-AAの生成および炭素源の実質的に完全な消耗が成就される初期の細胞増殖段階；(2) 細胞増殖が実質的に停止するまで微生物の細胞がこのように消耗された炭素源中にそのまま残存させられている実質的に完全消耗された炭素源段階；および(3) 炭素源が供給され、次いで細胞密度の実質的増加をもたらさずに溶存O<sub>2</sub>の存在下で追加量のL-AAを生産させるのに有効でありかつ第1濃度よりも低い第2濃度で発酵槽中に維持される調整された炭素源添加の段階からなる。

【0010】比較的低濃度（そこではL-AA生産が細胞増殖よりも優先される）での炭素源の添加はL-AAを生産する微生物の能力が実質的に消耗するまで継続させることができる。この点は該工程中の時間に関してのL-AA濃度および細胞密度をモニターすることによって決定することができる。本発明方法のその他の段階は、本技術分野で知られた手法による細胞の収穫並びに実質的に細胞性物質を含有しないL-AAの分離および回収を包含する。

【0011】細胞から回収されるL-AA生成物（バイオマス）はそのままで利用され得る。あるいはまた、L-AA含有バイオマスそれ自体はビタミンC強化の動物飼料組成物または例えば魚の水産養殖に使用するための飼料補足物として使用されうる。

【0012】本発明で使用する微生物は、それらがL-AA生産株、特に細胞内L-AAを従属栄養的に生産し

うるような微生物であるならば広範囲で変更することができる。好ましい微生物はL-AA生産性の緑色微小藻類であり、特に経済的理由からいわゆるL-AAの高生産株であって過剰生産株と称されることもある藻類である。L-AAの高生産株としての可能性の見込みがある生物は、L-AA生産を伴う細胞増殖のための標準的な発酵操作を用いて同定されうる。それらはまた、物理学的または化学的突然変異誘発手段例えばUV線、X線、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、ジメチルスルフェートまたは本技術分野で知られている類似の剤を用いて突然変異させるのが好ましい。このような処置によって得られた突然変異されたL-AA過剰生産株はレドックス色素で有利に決定することができる。さらに、アスコルビン酸への代謝中間体の類似体またはアスコルビン酸合成の阻止剤を用いることによって、化学的干渉の存在下でL-AA生産を維持または増加させうる微生物を選択することもできる。

【0013】前記操作の好ましい子孫は、細胞のグラム当りのL-AAのmgによって測定される（乾燥重量基準）L-AAの比生成を改善する微生物である。次いでこれらの子孫はさらに分離されて個々のクローンになりそしてさらに前記操作に付されることができる。

【0014】1つの好ましい微生物は緑色微小藻類のクロレラ (*Chlorella*) 属特に*Chlorella pyrenoidosa* UV 101-158菌株であって、突然変異誘発させるUV光線によるUTEX 1663菌株由来の高L-AA生産性突然変異体である。*C. pyrenoidosa* UV 101-158はATCCで寄託され、受託No. 53170が付与されている。別の好ましい*C. pyrenoidosa*菌株はUV 232-1であって、今までのところ最高の細胞内L-AAを生産した。*Chlorella*属のその他の代表的で適切な種は*Chlorella regularis* UTEX 1808菌株；およびUTEX 1808菌株の、UVで生成された高L-AA生産性の突然変異体である*C. regularis* UV 5-280である。さらにまた従属栄養的に増殖しうるその他の適切なL-AA生産性微小藻類は*Prototricha*属および*Ankistrodesmus*属に属するものである。代表的な*Prototricha*種は*P. zopfii* UTEX 1438菌株およびUTEX 1438の、UVで生成された高L-AA生産性の突然変異体である。代表的な*Ankistrodesmus*種は*A. braunii* ATCC 12744および高L-AA生産性でUVで生成された、ATCC 12744の突然変異体である*A. braunii* UV 2-370である。

【0015】前記の各場合において突然変異された子孫はその原生物よりも高いL-AA生産株である。さらに後記のように、各生物は慣用の従来技術での条件下よりも前記で定義した本発明条件の下において、栄養培地のリットル当りのL-AAのmgで表した場合により高い最高濃度のL-AAを生産する。

【0016】該方法の実施において栄養培地に、一般に

は第1の、概して低い濃度のL-AAを伴うが、程当な増殖期間後に高細胞密度をもたらすのに十分な量での微生物の活性増殖性培養菌を植える。典型的な初期の細胞密度は細胞の乾燥重量を基準にして一般的には約0.15～0.4g/Lである。培地は炭素源、多種の塩および一般的にはまた微量の金属を含有する。それはまた増殖促進量の炭素源とともに増殖を促進する量で供給される分子状O<sub>2</sub>源、一般的には空気も含有する。すなわち、高細胞密度までの増殖達成には、有効な炭素源およびO<sub>2</sub>の両方が微生物に利用されなければならない。

【0017】炭素源は通常、L-ガラクトースまたはD-グルコース由来であるが、経済的理由からはグルコースが好ましい。グルコース源は反応系中においてグルコースに変換されうるいずれかの炭水化物例えば、糖蜜、コーンシロップ等であるのがよい。用いられるグルコースの総量は個々の生物および所望される結果によって広範囲で変更可能である。通常、高L-AA生産性生物例えはC. pyrenoidosa UV 232-1の場合には、使用するグルコース源の総量は代謝されないならば、グルコースとして計算して約6.5～9.0g/Lである。より普通には約7.5～8.5g/L、好ましくは約8.0g/Lの濃度を提供する。通常では全グルコースの約15～30%、より普通には約20～25%が最初に添加される。グルコースは通常、初期にそして下記に示すその他の添加物とともに発酵中に添加される。初期のグルコース添加および発酵期間中は非制限的細胞増殖の期間であって、その際には細胞が比較的高い細胞密度にまで増殖し、一般には同時にL-AAが通常は比較的低い濃度で生成される。

【0018】発酵槽中のグルコース源の量は非抑制/非制限的量であるべきである。すなわち、その量は細胞増殖を最適に促進すべきであって、増殖を阻止したりまたは不当に制限したりすべきではない。グルコース源の最適な非増殖制限濃度は生物によって変化することもあるが、いずれか個々の生物に対するテストによって容易に決定される。例えはC. pyrenoidosa UV 101-158の場合におけるグルコース源濃度は1.5～3.0g/Lの範囲で適宜添加することによって維持される。該範囲は細胞増殖のグルコース阻止を回避しつつ細胞増殖を促進するに十分な濃度であることが見出されている。

【0019】望ましくは、その他の添加剤はグルコース源とともに初期に存在し、栄養培地中におけるそれらの濃度もまた一般的には、グルコース源の連続添加とともに該添加剤の逐次添加によって連続的に付与される。こ

れらの添加剤の濃度対グルコース源の濃度の比は発酵中に同一または相異なっていてもよい。

【0020】発酵槽に添加される全量に比して漸次添加される量のグルコースとは異なる割合を有することができる添加剤としては、アルカリ金属リン酸塩例えはリン酸ナトリウムおよびリン酸カリウム特に二塩基性リン酸ナトリウムおよび一塩基性リン酸カリウムとしてのそれらがある。二塩基性リン酸ナトリウムの全量は代表的には約1～2総量g/Lである。通常は約1～1.5総量g/Lである。好ましくは約1.3総量g/Lである。発酵槽中に最初に存在する二塩基性リン酸ナトリウムの量は通常、添加する二塩基性リン酸ナトリウム総量の約3.5～5.0%、より普通には約4.0～4.5%である。一塩基性リン酸カリウムの総量は通常約1.5～3g/Lである。より普通には約2～2.5g/Lである。最初に存在する量は一般的には全量の約4.0～5.0%、より普通には約4.5～5.0%である。

【0021】前記添加剤の外に、生物学的に許容しうるキレート剤例えはクエン酸ナトリウムを約0.8～1.2g/Lである。通常は約1g/Lの全量で添加するのが有利である。一塩基性リン酸ナトリウムは一般的には約0.8～1g/L好ましくは約0.95～1g/Lで存在する。生物学的に許容しうる鉛酸を加えることにより溶液中に微量金属を維持させそしてまた通常は窒素源として用いられるアンモニアを中和させる。好都合には濃硫酸がこのために約1～2ml/Lである。より普通には約1.2～1.5ml/Lの量で用いられる。金属の中でマグネシウムは約0.1～0.2g/L好ましくは0.1～0.15g/Lで存在するが、特に生理学的に許容しうる塩例えは硫酸塩として存在するのが好ましい。使用する鉄および銅の量は、これらの金属がアスコルビン酸の生成を抑制するために制限される。鉄(第1)は最初には約5～7mg/Lである。好ましくは約5.5～6mg/Lで存在し、いずれかその後の添加には含まれない。銅は比較的微量で存在し、一般的にはグルコース1g当たり約1～5.0μgである。

【0022】下記の微量金属溶液が約1.0～1.5ml/Lである。より普通には約1.2～1.4ml/Lの総量で用いられる。グルコースを基準にすると、この微量金属溶液は0.1～0.2ml/gに相当する。

【0023】好都合には、溶液は発酵過程中的添加用に調製され、下記組成を有する。

【表1】

培地組成

成 分	濃 度 (グルコース基準)
グルコース	1.0
クエン酸トリナトリウム, 2水和物	0.0125
硫酸マグネシウム, 無水	0.0082
一塩基性リン酸ナトリウム	0.0116
一塩基性リン酸カリウム	0.0238
二塩基性リン酸ナトリウム	0.0121
微量金属混合物	0.1675m1/g
硫酸 98% (w/w)	0.0329

【0024】補給される窒素は無水アンモニアによる。 20\* 【0025】微量金属混合物および溶液は下記組成を有する。  
これはまたpH調整剤としても使用される。培地中の実質する。  
Nレベルは培地の酸価および培地の緩衝能によって測定  
される。

\*

微量金属溶液

成 分	濃 度 (原液中の濃度)mg/リットル
塩化カルシウム, 2水和物	3102
硫酸マンガン(II), 1水和物	400
硫酸銅(II), 1水和物	0.4
塩化コバルト(II), 5水和物	40
ホウ酸	160
硫酸亜鉛(II), 7水和物	400
モリブデン酸ナトリウム, 2水和物	19
硫酸バナジル, 2水和物	20
硝酸ニッケル(II), 6水和物	8
セレン酸ナトリウム	18

【0026】微量金属の原液は痕跡量のHClを含有する蒸留水中に適切な量の種々の化合物を溶解することによって調製し、最終容量は1リットルであって濃HCl 20m1を含有する。蒸留水を用いて確実に各微量元素

成分の適正比を得る。

【0027】多数の塩を一塩基性または二塩基性と称しているけれども、これは便宜上であって必ずしも必要と50 いう訳ではないことを理解すべきである。これらの化合

9

物は緩衝剤として作用しそしてそれ故にプロトン化の程度が培地のpHで変化する。

【0028】発酵の実施において二塩基性リン酸ナトリウムおよび一塩基性リン酸ナトリウムを全培地の約75～90%、通常は約80～90%中に溶解して発酵槽に加える。

【0029】発酵過程中に漸次添加すべき溶液は個々の成分を適正比で合一することによって調製される。グルコースは使用すべき水の約75～85%、好ましくは約80%中に溶解する。クエン酸塩、マグネシウムおよび硫酸の各成分を約5～15%通常は約10%の水を含有する水性培地中で合一し、一方、リン酸塩は使用すべき水の約5～15%、より普通には約10%中で合一し、次いで微量金属溶液は使用すべき水全量の約5～15%より普通には約8～10%中で合一する。リン酸塩の一部分を含有する発酵槽に第1鉄塩および前記で調製したグルコースー塩類濃縮液約20%を加える。この添加は、いずれもの外来微生物の導入を回避するために無菌でなされる。

【0030】次に栄養培地を所望温度にする。この温度は微生物によって変更しうるが、しかし一般的には約30～40℃、好ましくは約35℃である。発酵槽に植菌すると一般的には約0.1～0.4g/リットルの初期細胞密度が得られる。少量の抗発泡剤は発酵過程中に添加することができる。

【0031】第1段階の発酵において細胞を高細胞密度にまで増殖させて本質的に高い総生産L-AAの基礎を構築し、そして炭素源が実質的に完全に消耗されるまで、すなわちそのグルコース当量濃度が通常、溶液のリットル当たり0.1gよりも低くなつて細胞不含の上澄液の状態になるまで細胞増殖を継続させる。必要とされる時間は生物によって変更しうるが、しかし通常は約35～50時間より普通には約40～45時間であり、生長比は約0.1～0.15時間<sup>-1</sup>である。

【0032】培地のpHは必要に応じて無水アンモニアを加えることによって所望範囲内で調整されうるが、一般的には約6.5～8.0である。

【0033】培地はこの増殖期間中に攪拌し、通気するのが有利である。攪拌速度は通常約200～1000rpmであり、通気速度は一般には1分当たり空気約0.2～0.6リットルである。しかしこれは生物およびその他の発酵条件によって変化しうる。通気により培地に分子状酸素(O<sub>2</sub>)が提供されるが、これは細胞増殖およびL-AA生産にとって必須である。その他のO<sub>2</sub>源を用いることも可能であり、例えば希釈されていないO<sub>2</sub>ガスおよびN<sub>2</sub>以外の不活性ガスで希釈されたO<sub>2</sub>ガスを使用することができる。O<sub>2</sub>源が何であれ、培地中における溶存O<sub>2</sub>含量は発酵過程中に調整して高細胞増殖およびL-AAの高細胞内含量取得を確実にさせる。栄養培地のO<sub>2</sub>含量は好都合にはO<sub>2</sub>プローブ電極を用いての標

10

準的手法によってモニターされうる。

【0034】この初期増殖段階中に微生物に利用されうるグルコースは上澄液中ですなわち培地の細胞不含成分中で好都合な手法例えばグルコースオキシダーゼ酵素試験、HPLCまたはその他の既知手法によってモニターされうる。グルコース濃度が下がる場合には、それは必要に応じて前記グルコースー塩類濃縮液のアリコート例えれば20%アリコートを加えることによって補充することができ、全グルコース濃度は、前述のように一般には約30g/リットル以下であるが、増殖抑制レベル以下で確実に存在させるようにする。グルコースアベイラビリティーは所望の高細胞密度が得られるまで維持される。例えばC. Pyrenoidosa UV 101-158では乾燥細胞重量基準で計算された細胞密度に関して約3.5～4.5g/リットル好ましくは約4.0g/リットルである。この時点で培地のグルコース含量は、既にこの状態に達していない場合には実質的に完全に消耗された状態になる。

20

【0035】所望の高細胞密度が取得され、培地のグルコース含量が実質的に完全に消耗された状態になった場合には、このグルコースの消耗された状態が維持される。すなわち、生物はその間飢餓状態に陥り、細胞の増殖は実質的に停止しそして細胞密度は最高に達する。細胞増殖の停止とともに、L-AAの生産もまた実質的に停止しうる。しかし、一般的には細胞は貯蔵デンプンを利用して、ある少額程度のL-AA生産を含めた細胞機能を維持することができる。

30

【0036】実質的に消耗されたグルコースおよび非増殖状態は生物が再びグルコース源を供給されるまで維持されるが、しかし該生物は調整された量で、細胞密度をほとんどまたは全く増加させずに追加量のL-AAの生産を開始する。飢餓期間は数分以下から数時間以上にわたるが、典型的には約1～4時間、より普通には2～4時間である。最適の飢餓時間並びに発酵槽へのグルコース源供給の最適量ないし割合はいずれもの個々の生物について、グルコース源を小試験量で加えそして時間に関するL-AA含量および細胞密度への効果をモニターすることによって測定されうる。L-AAの増加対存在するならば細胞密度の増加の比が増殖期間中におけるL-AA対細胞密度の最大比よりも大きい場合には、このような高められたL-AA生産状態はグルコース源を一般的には等時間間隔で、細胞密度の増加よりもL-AA生成が優先される量ないし割合において供給することにより維持される。このようにしていずれもの個々の微生物についての最適量および供給割合は、テストによって容易に決定されうる。代表的には、微生物としてのC. Pyrenoidosa UV 101-158の場合にはその供給割合は細胞の乾燥重量として扱った細胞1g当たり毎時グルコース約0.005～0.05gであり、そのグルコース含量は増殖促進濃度以下例えば溶液1リットル当たり約0.

40

50

11

1 g 以下に維持される。

【0037】本発明方法ではその他の天然産源例えばバラの実から得られる収量よりも遙かに高い高収量で細胞内L-アスコルビン酸が得られる。バイオマス物質の3.5%を越えるレベルが達成され得、4.0%以上のレベルも達成可能である。L-アスコルビン酸の濃度は1.45 g/リットルを越えることができそして3.3 g/リットル以上であることが可能である。消費される基質を基準にして、少なくとも約0.01であるモル収量が得られる。

【0038】以下の本発明を実施例により説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

【0039】実施例1

1リットル発酵槽中に、蒸留水0.6リットル、二塩基性リン酸ナトリウム0.23 gおよび一塩基性リン酸カリウム0.27 gを入れて滅菌した。次にこのリン酸溶液に蒸留水5 ml中における硫酸第1鉄(7水和物)1.2 mg並びに下記のようにして個別に滅菌し、冷却後に合一した栄養素の各グループ

グループ1

5.6 gグルコース、食物等級、1水和物  
(無水ベース) (8.0 g/リットル)

8.0 mlの水に溶解

グループ2

0.7 gクエン酸トリナトリウム、2水和物(1.0 g/  
リットル)

硫酸マグネシウム、無水(0.66 g/リットル)およ

12

び

1 ml硫酸(水10 ml中において1.4 ml/リットル)

グループ3

0.65 g一塩基性リン酸ナトリウム(0.97 g/リットル)

1.3 g一塩基性リン酸カリウム(1.9 g/リットル)

0.6 g二塩基性リン酸ナトリウム(0.97 g/リットル)

1.0 mlの水に溶解

グループ4

9.4 ml微量金属溶液

を用いて調製した滅菌性グルコースー塩類濃縮液20 mlを無菌で加えた。

【0040】温度を35℃に上昇させ、攪拌を約200 rpmで開始した。空気を毎分0.2リットル(1pm)の割合で培地に通過させ、約0.3 g細胞/リットルの濃度でChlorella pyrenoidosa UV 101-158の50 mlを加えた。5時間後に攪拌速度を400 rpmに増加し、空気流を0.4 lpmにした。16時間後に攪拌速度を500 rpmに上げ、空気流を0.6 lpmにした。その後攪拌速度を表3に記載のように700 rpm次に800 rpmに増加し、その間空気流は残りの実験の間0.6 lpmで一定であった。

【0041】下記表には発酵のための条件および分析結果が記載されている。

【0042】

【表3】

時間 hr	pH	細胞密度 g/リットル	アスコルビン酸 mg/リットル	注　　釈
0	6.9	--		
5	6.6	0.7		400rpm; 空気0.4 lpm
16	6.9	3.8		550rpm; 空気0.6 lpm
21	7.0	9.5		700rpm; 20ml添加
24	6.9	14.2		800rpm; 20ml添加*
36				グルコース消費
40	7.1	38.6	538	4ml添加+
45	7.2	38.6	654	
48				4ml添加+
51	7.6	38.1	775	2ml添加+
65	7.7	37.8	966	
68	7.8		1050	4ml添加+
92	7.6	37.2	1292	
101	7.3	36.1	1459**	

\* グルコース／塩の濃縮液

+ 20%グルコース、この添加は発酵過程中周期的に繰返された。

\*\* 0.04 g L-AA/g 細胞乾燥重量または乾燥バイオマスの4

重量%に相当する。

【0043】L-アスコルビン酸の測定に用いる手法は Grun and Loewus, Analytical Biochemistry(1983)13 0:191~198に記載されている。該手法は7.8×300 mm有機酸分析カラム、HPX-87(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)を用いるイオン交換法である。条件は以下のとおりである。移動相、0.013M硝酸、流速0.8ml/分、圧力1500psig、検出、UV 245~254nm。これらの条件でL-アスコルビン酸およびイソアスコルビン酸の分割が可能である。

【0044】リットル当りの細胞のグラム数を測定するには下記の操作を用いる。

【0045】バイオマス試料(5ml)を1つの計量パンに移し、上澄液5mlを第2の計量パンに移す。上澄液は遠心分離にかける。各パンを対流式オーブンで乾燥する(105℃で3時間)。デシケータ中で冷却後に各パンの含量を計量する。リットル当りの細胞のグラム数は(試料重量-上澄重量)×200として決定される。

【0046】上記結果に基づいて、細胞1g当りのアスコルビン酸のグラム数を基準とした比生成は少なくとも0.04で成就される。消費されたグルコースのモル当たり生成されるL-アスコルビン酸のモル数として定義さ

れるモル収率は少なくとも0.01以上である。さらに、アスコルビン酸濃度は少なくとも約1.5g/リットルに上昇させることができる。

#### 【0047】実施例2~10

Chlorella pyrenoidosa UTEX 1663菌株、UV 101-158菌株(=上記の1663菌株のUVで生成された突然変異体)およびUTEX 343菌株; Chlorella regularis UTEX 1808菌株およびUV 5-280菌株(=上記1808菌株の、UVで生成された突然変異体)、Prototricha zopfii UTEX 1438菌株およびUV 3-132菌株(=上記1438菌株のUVで生成された突然変異体)並びにAnkistrodesmus braunii ATCC 12744菌株およびUV 2-370菌株(=上記12744菌株のUVで生成された突然変異体)を用いて実施例1の操作を実質的に記載のようにして繰返した。

【0048】これらの実施例で本発明を説明するのに選択された3種の微小藻類の属すなわちChlorella, PrototrichaおよびAnkistrodesmusは分類学上広く分岐しており、L-アスコルビン酸生産性の従属栄養的微小藻類を代表する属であると思われる。

【0049】上記種のそれぞれを供給バッチの1リットル攪拌ジャー発酵槽中で増殖させて約40g/リットルの細胞密度(乾燥重量基準)を得た。栄養素の窒素はアンモニアの添加により補充し、そしてpHもアンモニアの添加により調整した。細胞はグルコースに基づく栄養素を使い尽くしてしまった後に、1~3時間にわたり、追加グルコースのない状態に入った。その後1日に2回の分析によってアスコルビン酸の合成がピークになってから衰えてきたことが指摘されるまで細胞に3時間毎に細胞の乾燥重量のグラム当りグルコース0.3gを付与し10た(下記表には増殖後のグルコースバルシング(pulsing\*

\*g)として示されている)。下記表中にはこれらの実験結果が小見出し“増殖後のグルコースバルシング”の欄において“Yes”によって示されている。

【0050】対照実験はグルコース消費まで同一の供給バッチ条件下で同一菌株を用いて実施した。しかし、グルコース消費後には追加栄養素を全く加えなかった。この増殖条件は“増殖後のグルコースバルシング”の欄において“No”によって示されている。

【0051】

【表4】

実施例	微生物	増殖後の グルコース バルシング	アスコルビン 酸の最高濃度 (mg/リットル)	最大比生成 (mg/g細胞)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>				
対照	UTEX 1663	No	38	1.07
2	UTEX 1663	Yes	54	1.24
対照	UV 101-158	No	570	12.9
3	UV 101-158	Yes	753	17.0
対照	UTEX 343	No	38	0.7
4	UTEX 343	Yes	38	0.66
<i>Chlorella regularis</i>				
対照	UTEX 1808	No	15	0.34
5	UTEX 1808	Yes	28	0.38
対照	UV 5-280	No	26	0.54
6	UV 5-280	Yes	32	0.65
<i>Protoheca zopfii</i>				
対照	UTEX 1438	No	24	0.7
7	UTEX 1438	Yes	56	2.1
対照	UV 3-132	No	50	2.5
8	UV 3-132	Yes	157	6.8
<i>Ankistrodesmus braunii</i>				
対照	ATCC 12744	No	25	0.56
9	ATCC 12744	Yes	30	0.40
対照	UV 2-370	No	49	1.4
10	UV 2-370	Yes	65	1.2

【0052】上記表の結果は本発明のグルコースバルシング条件下で増殖した4種のそれぞれの単離物(菌株)およびそれの対応して誘導された高アスコルビン酸生産性菌株が、単純な供給バッチ条件すなわち増殖後に全くグルコース添加のない状態の下での増殖に比して、mg/リットルでのアスコルビン酸最高濃度として表現される高められた収量のアスコルビン酸を生産することを示している。これらの結果はまた*C. pyrenoidosa* UTEX 1663およびその高L-AA生産性のUV 101-158突然変異株、*C. regularis* UTEX 1808およびその高L-AA生産性のUV 5-280突然変

40 異株並びに*P. zopfii* UTEX 1438およびその高L-AA生産性のUV 3-132突然変異株が全て本発明条件の下でL-AAの高められた比生成(mg/g細胞)をもたらすことが示されているが、それは初期増殖工程およびグルコース消費工程の後にグルコース添加なしで得られる場合と比較してアスコルビン酸生産用の炭素源の利用が改善されていることを指摘している。

【0053】*C. pyrenoidosa* 343菌株はその他の*C. pyrenoidosa*菌株に比していずれの組合せの条件下でもアスコルビン酸収率を高めなかったこと;さらにまた*Ankistrodesmus braunii*菌株のそれが本発明条件下で

より高濃度のアスコルビン酸を生成したけれども、いずれも全く核酸の比生成を改善させることはなかったことが注目されよう。しかし、この点に関しては初期増殖工程およびグルコース消耗工程の後に用いられる特定の組合せの条件がC. pyrenoidosa UTEX 1663菌株にとって最適とされたが、C. pyrenoidosa UTEX 343またはA. braunii ATCC 12744またはUV 2-370のいずれかに関してアスコルビン酸生産を高めるための条件を操作する試みは全くなされなかつたことが注目されよう。これらの生物に関しても同様に同じように改善された結果が得られる可能性があると信じられる。

#### 【0054】実施例11（最良の方法）

(a) 硫酸第1鉄5.6mgを11.2mgの代りに初期の0.6リットル蒸留水仕込み中に用いた；(b) 栄養溶液が蒸留水40ml中のグルコース2.8g；20ml中におけるクエン酸トリナトリウム2水和物0.53gおよび硫酸マグネシウム0.2g；20ml中におけるリン酸モノカリウムおよびリン酸ジナトリウムの各々0.65g；並びに1.5ml中における微量元素溶液4.7mlおよび硫酸1mlからなった；および(c) 活性増殖培養が表1のUV 232-1菌株であったことを除外して実施例1の操作に従つた。

【0055】温度は35℃に上昇させ、攪拌は350rp

mで開始し、空気は0.2リットル/分(lpm)で培地に通し、pHは空気流に加えた無水アンモニア(NH<sub>3</sub>)で6.9に調整しそしてUV 232-1菌株を培地に加えた。NH<sub>3</sub>は実験中に栄養素の窒素源およびpH調整剤として供給した。6.2時間後に空気流は0.6 lpmに上昇させ、攪拌は400rpmにした。11.8時間後に空気流は0.6 lpmに上昇させ、残りの実験でもそれを保持し、攪拌速度は650rpmに上げた。12.4時間後にはグルコース含有の栄養溶液40ml以上を発酵槽に加え、次いで24.4時間後には20ml以上をそして26.3時間後には15ml以上を加えた。その間攪拌速度は22.8時間後に750rpmに上昇させ、次いで34.8時間後には900rpmに調整しそして残りの実験では該速度を維持した。

【0056】培地のグルコース含量は31.7時間後に消耗された状態になり、その時点で細胞密度(C. D.)は19.5でありそしてL-AA濃度は322mg/リットルであった。グルコース(10%溶液2ml)を41.7時間後および41.7時間～94.8時間の間は3時間毎に発酵槽に供給した。細胞密度およびL-AA濃度を、バイオマスの計算されたL-AA含量とともに下記表に示された時間について追跡した。

【0057】

【表5】

時間 hr	pH	C. D. g/l	L-AA mg/l	(11)	
				バイオマス 注釈	重量% L-AA
0	6.9	--			
6.2	6.9				
11.8	6.9			12.4時間に40ml 24.4時間に20ml	
22.8				26.3時間に15ml のグルコース添加	
31.7	6.9			グルコース消耗状態	
34.8	7.0	19.5	322		1.7
				*	
46.9	7.7	18.7	429		2.3
53.6	7.8		528		
58.6	7.8	17.9	613		3.4
70.8	7.9		694		
77.7	7.9	17.3	819		4.7
82.8	7.8		915		
94.8	7.6	17.6	945		5.4

\* 10%グルコース2mlが41.7時間後に加えられ、その後

94.8時間後までは3時間毎に加えられた。

【0058】前記操作を4回以上、実質的に記載されているようにして繰返した。L-AAの%は5回の実験で、バイオマスの乾燥重量の5.2%で平均していた。

【0059】以上、本発明を詳細に説明したが、本発明はさらに次の実施態様によってこれを要約して示すことができる。

#### 1. 下記工程：

(a) 細胞増殖およびL-アスコルビン酸生産に十分なそれぞれの量で適当な炭素源および溶存酸素を含有する増殖促進栄養培地中において、L-アスコルビン酸を従属栄養的に生産させうる微生物の細胞を従属栄養的に増殖し、

(b) 生物を初期段階で高細胞密度にまで増殖させ、それに付随して第1のアスコルビン酸量を生成し、次いで炭素源を実質的に完全に消耗させ、

(c) (1) 細胞増殖が実質的に停止しそして(1)それに続く調整された量の炭素源の添加が、実質的に細胞密度を全く増加させずに追加量のL-アスコルビン酸の生成をもたらすまで、細胞を溶存酸素の存在下でかつ炭素源の実質的に完全な不在下において維持し、

(d) L-アスコルビン酸生産の望ましい増加が、実

質的に細胞密度の増加を伴わずに達成されるまで調整された炭素源添加を継続するからなるL-アスコルビン酸の生産方法。

【0060】2. 工程(d)における、生産されたL-アスコルビン酸の全量対全細胞密度の割合が、細胞増殖が実質的に停止しそして細胞密度の増加が止まった時の工程(c)でのかかる割合よりも大きい前項1記載の方法。

3. アスコルビン酸が、実質的に細胞性物質を含有しない細胞から回収される前項1記載の方法。

【0061】4. 炭素源が非抑制量で存在する前項1記載の方法。

5. 炭素源がグルコース源である前項1記載の方法。

6. グルコース源が、発酵過程中に栄養培地中の反応系中においてグルコースに転化される糖類または多糖類である前項5記載の方法。

7. グルコース源がグルコースを含有する前項5記載の方法。

【0062】8. 微生物が緑色の微小藻類である前項1記載の方法。

9. 微小藻類がクロレラ (Chlorella) 属の種である前

項8記載の方法。

10. 種がピレノイドサ (*pyrenoidosa*) である前項9記載の方法。

11. 生物が、*C. pyrenoidosa* UTEX 1663の突然変異菌株であってA.T.C.C.受託No.53170を有するUV 101-158と指名された*C. pyrenoidos*

aの菌株である前項10記載の方法。

【0063】12. A.T.C.C.受託No.53170を有する*Chlorella pyrenoidosa*の菌株。

13. UV照射による*Chlorella pyrenoidosa*由来の*C. pyrenoidosa* UV 232-1菌株。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 12 R 1:89

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 ジエフリー・エイ・ラニング  
アメリカ合衆国ウイスコンシン州54220。  
マニトウォツク、ノースフィフストリート  
834

(72)発明者 トマス・ジエイ・スカツトラド  
アメリカ合衆国ウイスコンシン州53051。  
メノモニーフオールズ、カントリーサイド  
ドライブ エヌ・76・ダブリュー・15873

File 351:Derwent WPI 1963-2006/UD,UM &UP=200602

(c) 2006 Thomson Derwent

\*File 351: For more current information, include File 331 in your search.

Enter HELP NEWS 331 for details.

Set	Items	Description
? S	PN=JP 6046870	
S1	1	PN=JP 6046870
? T	S1/7	

1/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009627209

WPI Acc No: 1993-320758/199340

L-ascorbic acid prodn. in microorganisms - involves adding additional controlled amts. of carbon source when first growth stage ceases

Patent Assignee: BIO-TECH RESOURCES LP (BIOT-N); BIO TECH RESOURCES (BIOT-N)

Inventor: HUSS R J; RUNNING J A; SKATRUD T J

Number of Countries: 042 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9319192	A1	19930930	WO 93US2429	A	19930318	199340 B
CA 2091918	A	19930919	CA 2091918	A	19930318	199350
AU 9339218	A	19931021	AU 9339218	A	19930318	199407
JP 6046870	A	19940222	JP 9358696	A	19930318	199412
CN 1083110	A	19940302	CN 93104652	A	19930318	199524
CA 2091918	C	19980728	CA 2091918	A	19930318	199841
JP 2815127	B2	19981027	JP 9358696	A	19930318	199848

Priority Applications (No Type Date): US 92853379 A 19920318

Cited Patents: 2.Jnl.Ref; EP 207763; US 5001059

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9319192 A1 E 22 C12P-017/04

Designated States (National): AU BB BG BR CA CZ FI HU JP KP KR LK MG MN NO NZ RO SK UA VN

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT KZ LU MC MW NL OA PT RU SD SE

AU 9339218 A C12P-017/04 Based on patent WO 9319192

JP 6046870 A 12 C12P-007/58

JP 2815127 B2 11 C12P-017/04 Previous Publ. patent JP 6046870

CA 2091918 A C12P-017/04

CN 1083110 A C12P-017/04

CA 2091918 C C12P-017/04

Abstract (Basic): WO 9319192 A

Prepn. of L-ascorbic acid comprises (a) heterographically growing cells of a suitable microorganism in a medium contg. a carbon source and dissolved oxygen; (b) allowing an initial stage growth to high cell density, producing a first amount of ascorbic acid and completely depleting the carbon source; (c) maintaining the cells in the complete absence of carbon source in presence of dissolved oxygen until cell growth ceases; (d) adding controlled amts. of carbon source to produce additional quantities of L-ascorbic acid with no increase in cell density, and (e) continuing controlled carbon source addn. in presence of dissolved oxygen until desired increase in L-ascorbic acid prodn. is attained. The Chlorella pyrenoidosa strain ATCC No. 53170, or strain

UV-232-1 descended from C.pyrenoidosa by UV radiation are claimed.

ADVANTAGE - Enhanced utilisation of the carbon source and high prod. yields are obtd.

Dwg. 0/0

Derwent Class: B03; D16; E13

International Patent Class (Main): C12P-007/58; C12P-017/04

International Patent Class (Additional): A23K-001/16; C12N-001/12;

C12N-001/14; C12N-015/01; C12P-017/04; C12R-001-89; C12P-007/58